

PARTICULARITĂȚI ALE ANGIOGENEZEI ÎN DIVERSE TIPURI HISTOLOGICE DE CARCINOM

Natalia Doicov, dr., Anatolie Cernîi, dr. hab., profesor universitar, Iraida Iacovlev, dr. hab., profesor universitar, Nina Bogdanskaia, dr.hab., conferențiar cercetător, Inga Chemencedji, Irina Caraman,

Laboratorul științific Morfologia tumorilor, IMSP Institutul Oncologic, Moldova

n.doikova@mail.ru, t.069837037

Rezumat

În această lucrare sunt prezentate rezultatele studiului histologic, imunohistochimic și de microscopie electronică a caracteristicilor angiogenezei în carcinoamele diverselor organe cu diferite tipuri de epiteliu (de col uterin, cavitate bucală, orofaringe, esofag, laringe, penis, piele, vezică urinară, stomac, colon, endometriu, glandă tiroidă, glandă mamară). Densitatea microvaselor a fost studiată cu ajutorul markerilor CD31, CD34, D2-40, anticorpi la actina musculară netedă. Rezultatele obținute demonstrează că angiogeneza are o legătură cu potențialul invaziv de carcinom, cel mai pronunțat în zona frontului de invazie la periferia tumorii. Au fost identificate anumite diferențe privind densitatea structurilor microvasculare în funcție de stadiul procesului neoplazic, gradul de diferențiere și formele histologice de carcinoame.

Cuvinte-cheie: angiogeneză, carcinom, imunohistochimie, densitatea microvaselor

Summary. Peculiarities of angiogenesis in various histological types of carcinomas

The following study represents results of histological, immunohistochemical, electromicroscopical research of angiogenesis specialties in carcinomas of various organs with different type of epithelium (cervix, oral mucosa, pharynx, esophagus, larynx, penis, skin, bladder, stomach, colon, endometrium, thyroid gland, mammary gland). In the course of research were studied density of microvessels using CD31, CD34, D2-40 markers, netted muscles actin-antibodies. The results evidence a relation of angiogenesis and invasive potential of carcinomas, which is emphasized at invasion zones

of tumor periphery. Were identified certain differences in density of microvessel structures depending on the stage of neoplastic process, grade of differentiation and histological type of carcinoma.

Key words: angiogenesis, carcinoma, immunohistochemistry, density of microvessels

Резюме. Особенности ангиогенеза в различных гистологических типах карцином

В данной работе представлены результаты гистологического, иммуногистохимического, электронномикроскопического изучения особенностей ангиогенеза в карциномах разных органов с различным типом эпителия (шейки матки, слизистой полости рта, ротоглотки, пищевода, гортани, пениса, кожи, мочевого пузыря, желудка, толстого кишечника, эндометрия, щитовидной железы, молочной железы). Изучалась плотность микрососудов с применением маркеров CD31, CD34, D2-40, антител к гладкомышечному актину. Полученные данные свидетельствуют о связи ангиогенеза с инвазивным потенциалом карцином, наиболее выраженным в области фронта инвазии по периферии опухоли. Выявлены определенные различия в плотности микрососудистых структур в зависимости от стадии неопластического процесса, степени дифференцировки и гистологической формы карцином.

Ключевые слова: ангиогенез, карцинома, иммуногистохимия, плотность микрососудов.

Introducere

O mare parte a cercetărilor din oncologia fundamentală se axează asupra particularităților celulelor tumorale. O atenție mult mai mică este acordată stromei tumorale, deși este știut că angiogeneza (neovascularizarea) stromală are un rol crucial în progresia tumorală [6,12]. În prezent se știe că angiogeneza, care este definită ca proces de formare al unor vase sanguine noi, este un proces fundamental pentru creșterea tumorală [9,10,11,12]. Densitatea vasculară, arhitectura și expresia factorilor angiogenici se corelează cu evoluția tumorii în majoritatea studiilor [1,3,4,8].

Scopul proiectului

Studiul angiogenezei în carcinoamele de diferită structură histologică și diferită localizare, estimarea relațiilor dintre angiogeneză și gradul de progresie tumorală.

Material și metode

Au fost studiate morfologic prin metode histologice, imunohistochimice și electrono-microscopice peste 980 de carcinoame de diverse organe cu diferite tipuri de epitelii. Studiul a fost realizat pe materialul tisular biopsic, piesele de conizație și materialul postoperator. Cazurile de control au fost reprezentate de epiteliul normal, învecinat neoplaziilor. În 320 de cazuri de carcinom și procese displazice au fost identificate caracteristici ale angiogenezei. Prin metode imunohistochimice au fost cercetate displazii și carcinom in situ (CIN I-III) de col uterin (35 cazuri), carcinoamele pavimentoase de col uterin (59 cazuri), mucoasă orală (19 cazuri), faringe (18 cazuri), laringe (12 cazuri), esofag (6 cazuri), penis (6 cazuri), carcinoame mamare (30 cazuri), carcinoame tiroidiene (30 cazuri), carcinoame uroteliale (20 cazuri), adenocarcinoamele colorectale (33 cazuri), adenocarcinoamele gastrice (40 cazuri), adenocarcinoamele endometriale (31 cazuri).

Microdensitatea vasculară a fost evaluată prin

imunomarcarea secțiunilor cu markeri pentru celule endoteliale (CD31, CD34, D2-40, anti-actina mușchilor netezi „Dako”). Densitatea microvasculară a fost apreciată după metoda Weidner (metoda „hot spot”) [6], prin care vasele tumorale evidențiate imunohistochimic au fost numărate în câmpurile (cel puțin trei) cu densitatea vasculară cea mai mare, câmpurile fiind alese la amplificarea mică a microscopului (x100). Cuantificarea vaselor s-a efectuat la amplificarea mare (x400) a microscopului, fiind urmată de calcularea mediei aritmetice. Astăzi această metodă este aplicată extensiv pentru aprecierea densității microvasculare în tumori. Neoplaziile colului uterin (94 cazuri) au fost investigate imunohistochimic privind expresia factorului de creștere a endoteliului vascular VEGFA și expresia receptorilor factorului de creștere a endoteliului vascular VEGFR2.

Prin metoda electronomicroscopică au fost cercetate 6 carcinoame microinvazive, 20 carcinoame pavimentoase de col uterin, 8 carcinoame pavimentoase ale mucoasei orale și 11 carcinoame faringiene. Pentru microscopia electronică piesele tisulare au fost fixate în aldehidă glutarică tamponată 5%, pH-7,4, M-0,1, postfixate în tetraoxidă de osmiu 1% în tampon fosfat pH-7,2, M-0,1. După deshidratare, materialul a fost inclus în epon-aralgid. Secțiunile ultrafine au fost contrastate cu citrat de plumb și acetat de uraniu, și au fost examinate la microscopul electronic JEM-100SX.

Rezultate

La etapele incipiente au fost investigate carcinoamele pavimentoase ale epitelului de suprafață a mucoaselor diferitor organe. În colul uterin au fost studiate distribuția și densitatea microvaselor CD 31-pozitive și CD 34-pozitive (CD 31+, CD34+).

Rezultatele obținute au arătat că, în mucoasa exocervixului acoperită cu epitelii pavimentos stratificat predomină vase de tip matur, mult mai puțin vase sanguine de tip intermediar. Rețeaua capilară este dez-

voltată cel mai bine în imediata apropiere de epiteliul pavimentos stratificat de suprafață. La displazie ușoară a epiteliului pavimentos stratificat (CIN1), distribuția și numărul microvaselor sanguine CD 31+ nu se deosebea semnificativ de numărul microvaselor în cervixul normal (densitatea microvasculară $15,4 \pm 1,2$). Însă, odată cu creșterea severității proceselor displazice, densitatea microvasculară în zona subepitelială se mărește. La displazie moderată (CIN2), densitatea vaselor sanguine era ceva mai mare ($19,8 \pm 1,5$). O creștere semnificativă a numărului de vase sanguine a fost constatată în cazurile displaziei severe și a carcinomului „in situ” (CIN3). În aceste cazuri a fost constatată prezența multiplelor vase sanguine (cu o densitate de $31,1 \pm 3,5$), localizate la interfața stromei cu epiteliul neoplazic (Tab.1).

O creștere și mai mare a densității de microvase a fost constatată în cazurile de microcarcinom ($36,8 \pm 3,4$). Cea mai mare densitate a microvaselor a fost identificată în carcinomul invaziv pavimentos ($49,2 \pm 4,7$), care este deosebit de pronunțată în regiunea frontului de invazie tumorală în comparație cu centrul tumorii. O legitate similară a fost determinată și în procesul studiului microvaselor CD 34+, densitatea cărora în regiunea frontului de invazie a carcinomului pavimentos nekeratinizat ajunge până la $54,3 \pm 5,1$.

Sunt cunoscuți diferiți factori care stimulează angiogeneza, incluzând factorul de creștere vascular endotelial (VEGF) [1,7]. Excesul de expresie VEGF induce și susține angiogeneza tumorală [9]. Acest factor este produs de celulele proliferative ale tumorilor maligne. Astfel de tumori sunt denumite ca fenotip angiogen. Spre deosebire de tumorile epiteliale de alte localizări, în care, conform literaturii de specialitate, doar 10% din celulele tumorale produc VEGF [7], în studiile noastre, în cele mai multe celule de neoplazii cervicale au fost menționate reacții pozitive cu anticorpi la VEGF de diferită intensitate. Tot odată, VEGF nu a fost depistat în zonele normale ale colului uterin. La displazie ușoară (CIN1) citokinel se depista în cantități nesemnificative. Creșterea expresiei VEGF a fost observată la CIN 2-3, adică cu mult mai înainte de apariția, de fapt, a cancerului. În carcinomul invaziv pavimentos de col uterin VEGF a fost determinat prin imunohistochimie la 60% dintre celulele epiteliale și stromale. Celulele tumorale au fost

pozitive pentru acest marker în 85,7% de cazuri. A fost constatată o creștere a expresiei VEGF în celulele tumorale a frontului de invazie, ceea ce indică la faptul că angiogeneza este cel mai activă la periferia tumorii.

În procesul dezvoltării neoplaziei are loc nu numai creșterea numărului de microvase, dar și modificarea structurii acestora. În rezultatul investigațiilor electronoptice efectuate, noi am constatat că perețele capilarelor situate sub epiteliul neschimbat, precum și sub focarele de displazie ușoară și moderată a fost formată din endoteliu și pericite. În carcinomul «in situ» apăreau capilare de tip imatur cu absența parțială sau totală a pericitelor, cu endoteliu fenestrat, cu rupturi în membrana subendotelială și, chiar, lipsa ei completă. În stroma subepitelială a colului uterin au fost observate vase limfatice D2-40 pozitive doar izolate, mărunte. Numărul acestora creștea ușor odată cu creșterea gradului de severitate a proceselor neoplazice. În procesele neoplazice a colului uterin au fost observate porțiuni de țesut conjunctiv de diferită densitate și focare de infiltrate de celule rotunde, compuse din macrofage, limfocite, celule plasmice, mastocite. Intensitatea acestor procese are legătură cu densitatea microvaselor.

Odată cu carcinomul pavimentos de col uterin au fost studiate cazurile de cancer pavimentos de alte localizări: cavitatea bucală, orofaringe, esofag, laringe, penis și cancer de piele.

În toate carcinomele pavimentoase ale mucoaselor a fost stabilită creșterea densității de microvase sanguine CD31- pozitiv comparativ cu numărul lor în sectoarele cu mucoasa normală, acoperită cu epiteliul nemalignizant. Cel mai mare număr de microvase a fost observat în regiunea frontală a invaziei. În majoritatea carcinoamelor s-a depistat o cantitate semnificativă de microvase imature actin- negative. Numărul vaselor limfatice D2-40+ crește ușor, comparativ cu mucoasa nemodificată.

Între carcinoamele pavimentoase, în special a pielii a fost evidențiat un grup de tumori care se deosebesc prin aranjament dens a straturilor canceroase mari, care sunt separate cu straturi subțiri unice de țesut conjunctiv, cu nenumeroase microvase. Densitate microvaselor CD31- și -CD34 pozitive în astfel carcinoame intratumorale este foarte scăzu-

Tabelul 1

Densitatea microvasculară a vaselor sanguine CD31+ din stroma conjunctivă în cadrul progresiei neoplaziei de col uterin

	Cazuri control (normă)	CIN1	CIN2	CIN3	Carcinom microinvaziv	Carcinom invaziv
Vase CD31+	14,1 \pm 2,1	15,4 \pm 1,2	19,8 \pm 1,5	31,1 \pm 3,5	36,8 \pm 3,4	49,2 \pm 4,7

tă și nu diferă în centrul tumorii ($CD31 + 9,1 \pm 2,8$ și $CD34 + 10,1 \pm 3,2$). Densitatea de microvase- $CD34$ pozitive este mult mai mare la periferie ($25,3 \pm 5,1$). Un alt grup de carcinom pavimentos se caracteriza prin formarea unor straturi canceroase mai mici, distanțate una de la alta și separate prin stromă exprimată cu infiltrare plasmocitară și limfoidă. În acest grup se distinge o distribuție mai uniformă a microvaselor în diferite zone ale tumorii (intratumoral și în regiunea frontului de invazie). Densitatea de microvase $CD34$ -pozitive intratumoral este de $23,8 \pm 3,6$, în frontul invaziei este de $27,7 \pm 3,9$. Astfel, densitatea microvaselor depinde de tipul de creștere a carcinoamelor.

Carcinoamele uroteliale a vezicii urinare, provenite din epiteliul de suprafață, denumit anterior ca tranzitoriu, au fost studiate în funcție de gradul de diferențiere și formele histologice: papilar și infiltrativ. S-a constatat o creștere a densității microvaselor $CD31+$ și $CD34+$ în carcinoame, comparativ cu densitatea de microvase în mucoasa nemalignizantă. Intratumoral, numărul lor este mai mare decât la periferie în toate tipurile de tumori. În carcinoamele papilare densitatea de microvase $CD34+$ intratumoral este de $26,5 \pm 6,4$, în zona de invazie – $21,1 \pm 6,4$; în carcinoamele infiltrative densitatea intratumoral este $31,5 \pm 8,2$, în zona de invazie – $23,5 \pm 6,7$. Numărul de microvase $CD34 +$ crește în funcție de reducerea gradului de diferențiere a tumorii atât în interiorul tumorii, cât și în frontul de invazie. Astfel, în carcinoamele bine diferențiate $G1$ densitatea microvaselor $CD34 +$ intratumoral este $23,6 \pm 7,4$, în frontul invaziei – de $23,3 \pm 8,9$; în carcinoamele slab diferențiate $G3$ densitatea microvaselor $CD34 +$ intratumoral este de $35,18 \pm 4,58$, în frontul de invazie de $30,35 \pm 4,78$. Cel mai mare număr de microvase imature actin-negative a fost depistat la periferia tumorii. Nu a fost evidențiată o diferență semnificativă între densitatea de microvase limfatice în carcinoamele papilare și carcinoamele infiltrative.

Investigarea adenocarcinoamelor tractului gastro-intestinal a demonstrat că densitatea microvaselor $CD31+$ este mai înaltă în toate tumorile comparativ cu mucoasa nemalignizantă. În stroma adenocarcinoamelor colorectale cu metastaze în ganglionii limfatici regionali numărul microvaselor $CD31 +$ ($27,0 \pm 5,2$) este mai mare decât în tumori nemetastazante ($18,9 \pm 3,9$). Mai mult decât atât, acest număr intratumoral este mai mare decât la periferie. La cercetarea densității microvaselor $D2-40$ -pozitive și a procentajului vaselor imature actin-negative, diferențe semnificative dintre cele două grupe de carcinoame nu au fost constatate. Conform datelor noastre, frecvența capilarelor imature actin-negative crește semnificativ în

zona frontului de invazie. Carcinoamele colorectale metastazante se caracterizează prin frecvență scăzută a formelor bine diferențiate ($6,7\%$) și prevalența tumorilor care concresec toate straturile peretelui intestinal ($93,3\%$). Potrivit rapoartelor, progresia și metastazarea cancerului este în mare măsură determinată atât de proprietățile agresive ale celulelor, cât și de particularitățile angiogenezei stromei (Raica M., 2010).

În adenocarcinoamele gastrice o astfel de diferență de densitate a microvaselor $CD-31 +$ în tumorile metastazante și nemetastazante nu au fost observate. Cu toate acestea, a existat o cantitate mai mare de vase actin-negative în tumorile gastrice metastazante cu o predominanță în frontul invaziei. Cel mai mare număr de microvase actin-negative imature au fost detectate în adenocarcinomul metastazant slab diferențiat cu infiltrația difuză. Frecvența de microvase imature actin-negative în tumorile metastazante a fost de $10,2\%$ intratumoral și $12,2\%$ în frontul de invazie; în tumorile nemetastazante, respectiv - $3,9\%$ intratumoral și $4,7\%$ în frontul de invazie.

În studiul de adenocarcinom al corpului uterin cea mai mică densitate a microvaselor $CD31+$ ($15,3 \pm 1,1$) a fost de a depista în adenocarcinoamele care creșteau în limitele endometriului. Iar cea mai mare densitate de microvase a fost observată în regiunea frontului invaziei de adenocarcinom care concrește mai mult de jumătate din miometru ($30,7 \pm 5,5$). Aceiași legitate a fost observată în numărul de vase limfatice $D2-40$ pozitive. Frecvența microvaselor imature constituia $2,3\%$ în adenocarcinoame care cresc în limitele endometrului și mult mai mult în adenocarcinoame cu invazie până la jumătate de miometru $12,9\%$. Endometrul diferă de alte tipuri de mucoase prin prezența unui număr mare de miofibroblaste ($12,1 \pm 3,0$), numărul căror crește în zona frontului de invazie a adenocarcinomului cu invazie cu mai mult de jumătate din miometru ($22,7 \pm 9,4$).

În carcinoamele ductale mamare invazive (în clasificarea modernă: carcinoame invazive de tip nespecific) a fost realizată cercetarea densității microvasculare în grupuri fără chimioradioterapie preoperatorie (fără PCT+RT) și cu chimioradioterapie preoperatorie (după PCT+RT). În fost evidențiate cazuri separate cu metastaze în ganglionii limfatici regionali (Mt) și fără metastaze (fără Mt). Diferențiere a carcinoamelor studiate, în fond corespundea $G2$, mai rar $G3$, se observau diferențe în densitatea microvaselor în diferite zone ale tumorii în funcție de expresia stromei. S-a constatat că în grupul 1, fără PCT+RT preoperator, în cazul cu MT densitatea $CD31+$ și $CD34+$ intratumoral aproape nu este diferit. Cu toate acestea, frontul invaziei, comparativ cu zona intratumorală, se

caracteriza prin creşterea densităţii microvasculare, în special CD34 +, pe alocuri cu formarea a mai multor fascicule, preponderent în cazurile cu metastaze (CD31+ fără Mt $22,6 \pm 5,6$, cu MT $26,8 \pm 5,0$; CD34 + fără Mt $28,3 \pm 11,3$, cu MT $48,2 \pm 11,6$). În carcinoamele cu MT numărul vaselor limfatice D2-40 + a fost semnificativ mai mare, numărul căroră, practic, nu diferă în zonele intratumorale şi periferice (MT D2-40 + $12,5 \pm 7,3$, fără Mt $7,4 \pm 3,7$). În grupul cu chimioradioterapie preoperatorie densitatea microvaselor a fost semnificativ mai mică; prin cea mai mică densitate microvasculară se deosebea zona de invazie atât în cazurile cu MT, cât şi fără MT (CD31 + fără Mt $5,5 \pm 2,6$, cu MT $7,9 \pm 4,09$).

În glanda tiroidă densitatea microvasculară a fost studiată în carcinoamele papilare şi foliculare. S-a constatat că în carcinomul papilar densitatea microvasculară depinde de gradul de diferenţiere a tumorii. În microcarcinoamele papilare slab diferenţiate densitatea microvasculară CD31 + şi CD34 + a fost mai mare în comparaţie cu formele înalt diferenţiate, în special în frontul invaziei. În zona frontului de invazie a carcinomului papilar slab diferenţiat au fost observate multe vase imature actin-negative cu formarea unor focare mici şi mari sub formă de fascicule compacte din vase mici adiacente, estimarea numărului căroră deseori nu era posibilă. Uneori, astfel de focare au fost depistate şi în zona intratumorală. Densitatea microvaselor CD34 + în forme bine diferenţiate intratumoral este de $26,3 \pm 10,7$, în frontul invaziei – $54,3 \pm 6,7$; în forme slab diferenţiate CD 34 + intratumoral – $37,4 \pm 15,6$, în frontul invaziei – $63,8 \pm 13,0$. În carcinomul tiroidian folicular densitatea microvasculară este semnificativ mai mare în comparaţie cu carcinomul papilar şi distribuţia vasculară este mai uniformă pe întreaga suprafaţă a tumorii. Cel mai mare număr de microvase sunt CD 34 pozitive $119,4 \pm 12,6$ intratumoral şi $140,9 \pm 4,9$ în frontul invaziei. (Cernîi A., 2013). În zona frontului de invazie a fost depistat un număr mare de microvase imature. În carcinomul papilar al glandei tiroide au fost identificate acumulări focale a microvaselor limfatice D2-40 +, în special intratumoral în centrele de infiltraţie limfoidă şi de fibroză.

Concluzii

Cercetarea angiogenezei în carcinoamele diferitor organe a permis identificarea caracteristicilor principale comune ale acestui proces. Neovascularizarea tumorii, care oferă posibilitatea de creştere şi progresie a acesteia, este un proces complicat şi multistadial, în care participă celulele tumorale, elementele stromale (fibroblaste, miofibroblaste), infiltrate celulare, fibre de collagen şi un şir întreg de factori de stimulare a angiogenezei.

- În toate cazurile studiate, densitatea microva-

selor în tumoare a fost mai mare decât în porţiunile nemodificate ale mucoasei sau ale parenchimului însuşi a organului.

- De exemplu, în colul uterin a fost depistată sporierea densităţii microvaselor odată cu creşterea severităţii proceselor neoplazice. În majoritatea carcinoamelor examinate (cu excepţia vezicii şi a colonului) densitatea microvaselor a fost semnificativ mai mare în regiunea frontală a invaziei comparativ cu zona intratumorală. De menţionat, că în regiunea frontului de invazie în toate carcinoamele, inclusiv şi a vezicii şi a colonului se detecta un număr mare de microvase imature actin-negative.

- În vasele imature parţial sau total lipseşte stratul pericitar, se observă defecte şi subţiere a membranei bazale în stratul endotelial, ceea ce contribuie la penetrarea celulelor tumorale în lumenul vasului şi la extinderea lor ulterioară.

- Factorul, care stimulează creşterea vaselor (VEGF), a fost depistat în cantităţi mari în celulele tumorale şi celulele stromei în procesele neoplazice ale colului uterin, preponderent în carcinoame invazive. În adenocarcinoamele endometrialului a fost depistat un număr mare de miofibroblaste, care, conform datelor din literatură, pot produce factorul de creştere care stimulează proliferarea celulelor tumorale şi angiogeneza [5].

- În carcinoamele metastatice ale tractului gastro-intestinal şi al glandei mamare s-a observat o densitate mare a microvaselor imature actin-negative, în special, în frontul de invazie. În cancerul mamar metastazat creşte densitatea microvaselor limfatice D2-40-pozitive. Capacitatea pentru dezvoltare şi metastazare depinde de mai mulţi factori: agresivitatea şi gradul de diferenţiere a tumorii, extinderea şi profunzimea de germinare, densitatea microvaselor imature în frontul de invazie şi structura însuşi a organului.

- Rezultatele obţinute demonstrează legătura angiogenezei cu potenţialul invaziv al carcinoamelor, cel mai pronunţat în zona frontului de invazie la periferia tumorii.

- S-a constatat că polichimioterapia şi radioterapia preoperatorie a cancerului ductal invaziv al glandei mamare inhibă puternic formarea de vase sangvine în zona de invazie, împiedicând astfel la creşterea tumorii.

- Cu toate acestea, angiogeneza depinde şi de particularităţile structurale ale organelor. Astfel, cancerul folicular al tiroidei, care se deosebeşte prin densitate înaltă ale microvaselor, se dezvoltă în organ cu un grad ridicat de vascularizare.

- Diferite tipuri identificate de creştere a cancerului pavimentos a pielii sunt însoţite de densitate diferită a vaselor intratumoral şi în frontul invaziei.

În prezent, gradul de vascularizare a carcinoamelor nu a primit încă statut de standard de diagnostic și tratament. Cu toate acestea, studiile clinico-morfologice efectuate ale tumorilor diferitor organe, indică necesitatea de apreciere a acestui indicator în ceea ce privește precizarea prognozei și optimizarea tratamentului.

Bibliografie

1. Barbu I., Crăițoiu S., Simionescu C.E., Drăginei A.M., Mărgăritescu C. CD105 microvessels density, VEGF, EGFR-1 and c-erbB-2 and their prognostic correlation in different subtypes of cervical adenocarcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2013; 54(3), p.519-30.
2. Cernîi A., Iacovlev I., Bogdanscaia N., Doicov N., Chemencedji I., Stancul I. Particularitățile angiogenezei în carcinoamele tiroidiene. *Buletinul AȘM, Chișinău* 2013; №4(40) p.160-162.
3. Mitchell J.C. Angiogenesis in benign and malignant thyroid disease, *Thyroid.* 2005; 15(6), p.494-510.
4. Mondal SK¹, Dasgupta S¹, Mandal PK¹, Chatterjee S¹, Chakraborty D². Is there any role of mast cell density and microvessel density in cervical squamous cell carcinoma? A histologic study with special reference to CD-34 immunomarker staining. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2014 Apr; 35(2), p.165-9.
5. Orimo A., Tomioka Y., Shimizu Z., Sato M., Oigawa S., Kamata K., Nogi Y., Inoue S., Takahashi M., Hata T., Muramatsu M. Cancer-associated Myofibroblasts Promote Various Factors to Promote Endometrial Tumor Progression *Clin Cancer Res* October 2001 7; 3097-3105.
6. Raica M., Cîmpean A.M., Gaje P.M., Ribatti D. Angiogeneza și limfangiogeneza tumorală. *Colecția Academica, Timișoara.* 2010; p.393.
7. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006; 9(4) p.225-30.
8. Stabenow E. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma, *Clinics (Sao Paulo).* 2005; 60(3), p.233-40.
9. Tzoutzos K., Batistatou A., Kitsos G., Liasko R., Stefanou D. Study of microvascular density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in cancerous and precancerous lesions of the eyelids. *Anti-cancer Res.* 2014 Sep; 34(9), p.4977-83.
10. Yazdani S., Kasajima A., Tamaki K., Nakamura Y., Fujishima F., Ohtsuka H., Motoi F., Unno M., Watanabe M., Sato Y., Sasano H. Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. *Hum Pathol.* 2014; 45(4), p.866-74.
11. Должиков А.А., Чурносков М.И., Быков П.М., Луговая О.А., Мухина Т.С., Савостина Л.А., Файнова И.А. Ангиогенез в раке молочной железы: клинико-морфологические и прогностические аспекты. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*, 2010, №4, p.148-155.
12. Козаченко А.В. Роль ангиогенеза в развитии шейки матки. *АГ-инфо.* 2012, №3, p.3-6.